



POWERED BY Dialog

Skin external agent for skin whitening, etc. - contains thioredoxin and thioredoxin reductase.
Patent Assignee: NOEVIR KK

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
JP 9012471	A	19970114	JP 95188029	A	19950629	199712	B

Priority Applications (Number Kind Date): JP 95188029 A (19950629)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
JP 9012471	A		8	A61K-038/00	

Abstract:

JP 9012471 A

Also claimed are skin external agents contg. thioredoxin, and thioredoxin reductase and redn. type nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH).

USE - The external agents are cosmetics (e.g. skin lotion, gel, milk lotion, or cream) for protection from UV inflammation, or skin-whitening. The additive amt. of thioredoxin and thioredoxin reductase is 0.01-10.0 wt.% of the agents, and that of NADPH is 0.01-10.0 wt.

In an example, skin lotion was prepd. from glycerol (5.0 wt.%), propylene glycol (4.0), ethanol (10.0), thioredoxin-thioredoxin reductase-containing (0.5 mg/ml of each) aq. soln. (0.2), methyl p-benzoate (0.1) and purified water (80.7).

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index

© 2002 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 11150737

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-12471

(43) 公開日 平成9年(1997)1月14日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADS		A 6 1 K 37/02	ADS
7/00			7/00	K
				X
7/48			7/48	
31/70			31/70	

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-188029

(22) 出願日 平成7年(1995)6月29日

特許法第30条第1項適用申請有り 1995年6月7日～6月8日、開催の「第2回アジア化粧品技術者会」において文書をもって発表

(71) 出願人 000135324

株式会社ノエビア

兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目13番地の1

(72) 発明者 岩本 敦弘

滋賀県守山市守山町885-4

(72) 発明者 正木 仁

滋賀県八日市市妙法寺町774-13

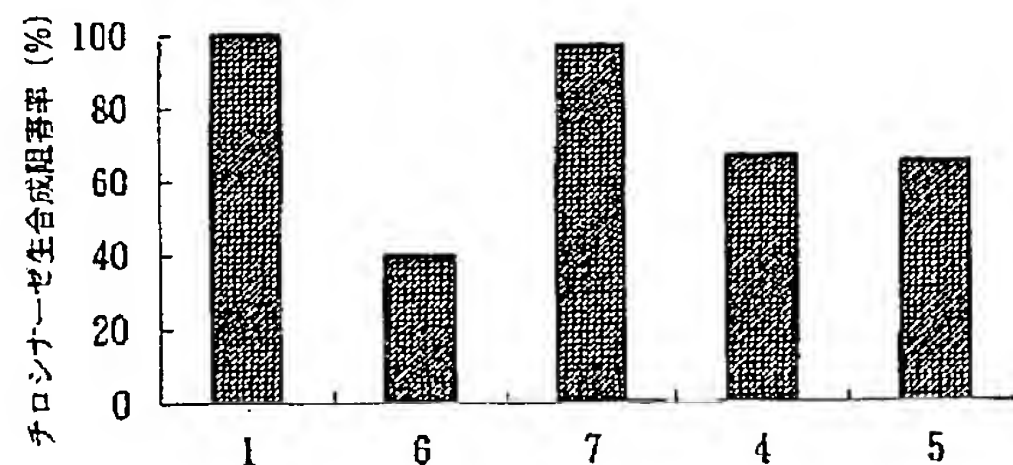
(74) 代理人 竹井 増美

(54) 【発明の名称】 皮膚外用剤

(57) 【要約】

【目的】 皮膚組織におけるレドックス制御機構を正常化し、より活性化して、種々の生理活性を有する皮膚外用剤を得る。

【構成】 細菌、植物或いは動物由来のチオレドキシシンと、チオレドキシシンリダクターゼとを含有させて皮膚外用剤とする。さらにニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADPH) を配合しても良い。紫外線等により生じる酸化ストレスから皮膚を保護し、皮膚細胞を賦活して優れた老化防止、改善作用を発揮し、さらにチロシナーゼの生合成を阻害することにより、優れた美白作用を示す。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼを含有することを特徴とする皮膚外用剤。

【請求項2】 チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼと、還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADPH）とを含有することを特徴とする、皮膚外用剤。

【請求項3】 皮膚外用剤が化粧品であることを特徴とする、請求項1に記載の皮膚外用剤。

【請求項4】 皮膚外用剤が化粧品であることを特徴とする、請求項2に記載の皮膚外用剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、紫外線等により生じた酸化ストレスから皮膚を保護し、さらに皮膚の線維芽細胞の増殖を促進して皮膚の老化を防止し、またチロシナーゼ生成阻害作用により優れた美白効果を発揮し得る、非常に生理活性の高い皮膚外用剤に関する。さらに詳しくは、チオレドキシンとチオレドキシンリダクターゼの複合体、或いは前記複合体と還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド（NADPH）とを含有して成る皮膚外用剤に関する。

【0002】

【従来の技術】紫外線、放射線、重金属などにより生じた活性酸素種は、動物の生体内において様々な反応を惹き起こすが、皮膚組織においても、これらの損傷や老化に深く関与することが知られている。このような酸化ストレスに対して、生体内ではさまざまな機構でレッドックス制御が行われている。そして、かかるレッドックス制御に関わる物質を皮膚外用剤に応用しようとする試みも見られ、グルタチオンエステルの配合（特公昭48-1505）、チオレドキシンの金属により触媒される酸化傷害への応用（特開昭62-246520、同63-230637）が知られている。

【0003】しかしながら、上記した従来用いられている技術においては、主としてグルタチオンやチオレドキシンの有する還元作用を利用したものであって、生体の有するレッドックス制御機構の正常化といった観点に立ったものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】今回、本発明では、皮膚組織において生体の有するレッドックス制御機構を正常化し、より活性化することにより、酸化ストレスに対する抵抗性を向上させ、酸化ストレスにより生じる種々の傷害反応を防止するという観点に立って、全く新しいタ

イプの皮膚外用剤を得ることを目的とした。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明において、われわれは特にチオレドキシンを中心としたレッドックス制御系に着目し、チオレドキシンとその還元酵素であるチオレドキシンリダクターゼの複合体を皮膚外用剤に配合することにより、酸化ストレスに対する抵抗性の向上、活性酸素種により生じる皮膚傷害の防止、改善作用の他に、優れた生理活性が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。また、さらに水素供与体である還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド（NADPH）を加えることにより、前記の生理活性がさらに高められることを見出した。

【0006】チオレドキシンは、分子量10,000～13,000のチオール（SH）基を有する電子伝達タンパク質で、リボヌクレオチドリダクターゼがリボヌクレオチドリリン酸をデオキシリボヌクレオチドリリン酸に還元する際の直接の電子供与体として作用する。生体内においては、チオレドキシンリダクターゼとともにレッドックス制御系を形成する。本発明においては、細菌、植物及び動物由来のチオレドキシン、チオレドキシンリダクターゼ及びNADPHを用いることができる。チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼは精製したものをを用いてもよいが、細菌や植物より調製したこれらの活性を有する分画成分をそのまま用いることができる。

【0007】チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼ含有画分の調製方法の一例を以下に示す。まずモルモット肝臓より得たアセトンパウダー3gを50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.2）中にて4℃で3時間抽出した。抽出液を0.5N塩酸で処理しpHを調整した後熱処理（65℃）し、Red Sepharose CL-6Bカラムにてチオレドキシンとチオレドキシンリダクターゼとを分離した。チオレドキシンリダクターゼ画分は、DEAE-Sephacelカラムにて0～0.3M、ついで0.3～1.0Mの濃度勾配の塩化カリウムにて溶出させてさらに精製した。一方チオレドキシン画分についても、DEAE-Sephacelカラムにて0～0.3Mの塩化カリウムにて溶出させ、インシュリン還元活性を有する画分を得た。その結果、表1に示すようなチオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分を得た。ここで、チオレドキシンリダクターゼ活性は、1分間に1nmolのNADPHを酸化する時1unitとして表した。

【表1】

	活 性 (units)	蛋白質 (μ g/ml)	比活性 (units/mg)	精製度
粗抽出物 (168ml)	536.10	5762.00	0.55	1.00
酸処理 (168ml)	573.20	2902.92	1.18	2.12
熱処理 (164ml)	1413.10	1147.34	7.51	13.56
チオレドキシンリダクターゼ	129.35	867.83	22.93	41.41
画分(A) (6.5ml)				
チオレドキシンリダクターゼ	76.90	504.52	25.40	45.80
画分(B) (6.0ml)				
チオレドキシン画分 (7.0ml)		543.94		

【0008】上記のチオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼには、種々の生理活性が認められた。それらについて以下に示す。なお、チオレドキシンリダクターゼ画分としては、表1の(B)画分を用いた。

【0009】(1)紫外線照射による細胞傷害に対する保護効果

マウスメラチノサイトを喜多野らによる修正MCDB153培地にて37℃で24時間培養した後、リン酸緩衝塩類溶液にて2回洗浄後、Hank's緩衝液に交換して、100 μ g/mlとしたチオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼ画分各100 μ lを添加し、FL-20S・Eランプを光源として300mJ/cm²の中波長紫外線(UVB)を照射した。照射後、メラチノサイトをMCDB153培地中で37℃で24時間インキュベートし、ニュートラルレッド法により細胞生存率を求めた。結果は、図1において、UVBを照射しない対照培養系(1)の生存率を100%として、チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼを添加しないでUVBを照射した系(2)、100 μ g/mlのNADPHのみを添加してUVBを照射した系(3)と比較して示した。

【0010】図1より、チオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分を添加した系(4)では、これらを添加しなかった対照培養系(2)に比べて、UVB照射後の細胞生存率は約130%に上昇していた。なお、NADPHのみを添加した系(3)では、有意な細胞生存率の上昇は認められなかった。

【0011】(2)線維芽細胞増殖促進効果

ヒト線維芽細胞を10重量%の牛胎仔血清を添加したDMEM培地にて37℃で24時間培養し、100 μ g/mlのチオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分或いはさらに100 μ g/mlNADPHを各100 μ l添加し、さらに37℃で24時間培養した後、細胞数をチオレドキシン等を加えない対照(1)、及びNADPHのみを添加した系(3)と比較して、図2に示した。

【0012】図2より、チオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分を添加した系(4)では、対照(1)に比べて112%の細胞増殖促進効果が認められた。さらにNADPHを加えた系(5)ではほぼ12

0%の細胞増殖促進が見られた。一方、NADPHのみを加えた系(3)では、有意な細胞の増殖は認められなかった。

【0013】(3)チロシナーゼ生合成阻害効果

100 μ g/mlのチオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分或いはさらに100 μ g/mlのNADPHを、マウスB16メラノーマ細胞の懸濁液(細胞数50,000程度)に添加し、10重量%牛胎仔血清を添加したDMEM培地にて24時間培養を行った後、以下の方法により細胞中のチロシナーゼ活性を測定した。すなわち、1/15Mリン酸緩衝液(pH6.8)2mlに1.0重量%のドーパ水溶液0.5ml及び培養細胞液0.5mlを混合し、37℃にて1時間インキュベートした後、405nmにおける吸光度(As)を測定した。対照として、精製水を添加して同様に培養し、培養細胞液とドーパ水溶液とをインキュベートして吸光度(As)を測定し、式(1)によりチロシナーゼ生合成阻害率を求めた。なお、ポジティブコントロールとして乳酸ナトリウムを最終濃度が0.3mMとなるように添加した系(6)、及びチオレドキシン画分を単独で添加した系(7)についても、同様にチロシナーゼ生合成阻害率を測定した。結果は図3に示した。

【数1】

$$\text{チロシナーゼ生合成阻害率(\%)} = \frac{A_s}{A_b}$$

【0014】図3より明らかなように、チオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分をともに添加した系(4)においては、細胞中のチロシナーゼ量は対照(1)の約60%まで減少していた。また、さらにNADPHを添加した系(5)においても同程度のチロシナーゼ生合成の阻害が認められた。一方、チオレドキシン画分を単独で添加した系(7)では、対照(1)に比べて有意なチロシナーゼ生合成量の減少は認められなかった。

【0015】本発明においては、チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼを水溶液として、或いはこれらを含む植物、動物の抽出画分の状態で外用剤基剤に添加し、皮膚外用剤とする。皮膚外用剤の剤形としては、ローション状、ゲル状、乳剤、軟膏等の形態をとることができる。また、柔軟性化粧水、収斂性化粧水、洗

浄用化粧水等の化粧水、エモリエントクリーム、モイスチュアクリーム、マッサージクリーム、クレンジングクリーム、メイクアップクリーム等のクリーム類、エモリエント乳液、モイスチュア乳液、ナリシグ乳液、クレンジング乳液等の乳液類、ゼリー状パック、ピールオフパック、粉末パック等のパック類及び洗顔料類といった種々の製剤形態の化粧料としても提供することができる。配合量としては、チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼを各0.5 μ g/ml含有する水溶液にして、ほぼ皮膚外用剤全量の0.01~10.0重量%程度が適当である。チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼとともに配合し得るNADPHの配合量としても、0.01~10.0重量%程度が適当である。

【実施例1】 皮膚用クリーム

(1)ステアリン酸	1.00 (重量%)
(2)ステアリルアルコール	4.00
(3)モノステアリン酸グリセリル	3.00
(4)硬化ヒマシ油	7.00
(5)流動パラフィン	14.00
(6)サフラワー油	2.00
(7)セスキオレイン酸ソルビタン	1.00
(8)水酸化ナトリウム	0.05
(9)カルボキシビニルポリマー	0.10
(10)チオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ	0.10
水溶液 (各0.5mg/ml)	
(11)パラオキシ安息香酸メチル	0.10
(12)香料	0.20
(13)精製水	67.45

製法：(1)~(7)の油相を75℃に加熱溶解する。一方、(8)、(11)を(13)の一部に加えて75℃に加熱溶解し、これに前述の油相を加えて乳化させた後、(13)の残部に

溶解させて増粘させた(9)を加え、ついで冷却し、40℃にて(10)、(12)を添加し、さらに室温まで冷却する。

【0019】

【実施例2】 液状皮膚外用剤

(1)グリセリン	5.0 (重量%)
(2)プロピレングリコール	4.0
(3)エタノール	10.0
(4)チオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ	0.2
水溶液 (各0.5mg/ml)	
(5)パラオキシ安息香酸メチル	0.1
(6)精製水	80.7

製法：(5)を(3)に溶解して(6)に加え、(1)、(2)、(4)を順次加えて混合、均一化する。

【0020】

【実施例3】 液状皮膚外用剤

(1)グリセリン	5.0 (重量%)
(2)エタノール	10.0
(3)チオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ	0.2
水溶液 (各0.5mg/ml)	
(4)NADPH	0.2
(5)パラオキシ安息香酸メチル	0.1
(6)精製水	84.5

製法：(5)を(2)に溶解して(6)に加え、(1)、(3)、(4)を

順次加えて混合、均一化する。

【0021】

【実施例4】 化粧水

(1) 1,3-ブチレングリコール	3.0	(重量%)
(2) ソルビトール	2.0	
(3) エタノール	2.0	
(4) ピロリドンカルボン酸ナトリウム	3.0	
(5) 胎盤抽出物のチオレドキシン含有画分	1.0	
(6) 胎盤抽出物のチオレドキシンリダクターゼ含有画分	1.0	
(7) カルボキシビニルポリマー 1.0重量%水溶液	2.0	
(8) パラオキシ安息香酸メチル	0.1	
(9) 香料	0.2	
(10) 精製水	85.7	

製法：(8)を(3)に溶解して(10)に加え、(1)、(2)、(4)～(7)、(9)を順次加えて混合、均一化する。

【0022】

【実施例5】 O/W型皮膚用乳剤

(1) 白色ワセリン	25.0	(重量%)
(2) ステアリルアルコール	25.0	
(3) ラウリル硫酸ナトリウム	1.0	
(4) チオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ 水溶液 (各0.5mg/ml)	0.5	
(5) NADPH	0.5	
(6) パラオキシ安息香酸メチル	0.1	
(7) 精製水	47.9	

(1)～(3)の油相成分を混合、溶解して均一とし、75℃に加熱する。一方、(6)及び(7)の水相成分を混合、溶解して75℃に加熱する。ついで前記水相成分に油相成分

を加えて乳化し、冷却後40℃にて(4)、(5)を添加、混合した後、さらに冷却する。

【0023】

【実施例6】 乳液

(1) スクワラン	5.0	(重量%)
(2) 白色ワセリン	2.0	
(3) ミツロウ	0.5	
(4) セスキオレイン酸ソルビタン	0.8	
(5) ポリオキシエチレン(20E.0)オレイン酸ソルビタン	1.2	
(6) プロピレングリコール	5.0	
(7) エタノール	5.0	
(8) 胎盤抽出物のチオレドキシン含有画分	1.5	
(9) 胎盤抽出物のチオレドキシンリダクターゼ含有画分	1.5	
(10) NADPH	0.1	
(11) カルボキシビニルポリマー 1.0重量%水溶液	20.0	
(12) パラオキシ安息香酸メチル	0.1	
(13) 水酸化カリウム	0.1	
(14) 香料	0.2	
(15) 精製水	57.0	

製法：(1)～(5)の油相成分を混合、溶解して均一とし、75℃に加熱する。一方、(6)、(12)、(15)の水相成分を混合、溶解して75℃に加熱し、これに前記油相成分を添加して予備乳化し、これに(11)を添加した後ホモミキサーにて均一に乳化する。その後冷却し、(13)を加えてpHを調整した後、40℃にて(7)～(10)及び(14)を添加、混合し、さらに冷却する。

【0024】 上記実施例について、紫外線による皮膚の

老化の防止効果、創傷治癒効果及び美白効果を評価した。

【0025】 まず、紫外線による皮膚の老化防止効果については、戸外で作業する20才～50才の男女パネラー20名を1群とし、各群にそれぞれ実施例及び比較例をブラインドにて顔面及び手に使用させ、しわ及び皮膚弾性の変化を肉眼観察と写真撮影、及び皮膚弾性率の測定により評価した。使用期間は紫外線照射量の多い4月

～9月の6カ月間とし、朝と夕方の1日2回使用させた。評価は、しわについては「減少」、「やや減少」、「変化なし」、「増加」の4段階、皮膚弾性については「上昇」、「やや上昇」、「変化なし」、「低下」の4段階にて行い、各評価を得たパネラー数にて表2に示した。なお、各実施例においてチオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ水溶液或いはチオレドキシン含有画分及びチオレドキシンリダクターゼ含有画分を精製水に代替したものをそれぞれ比較例1～比較例6とした。

【表2】

項目	評価	実施例						比較例					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
しわ	減少	12	17	18	7	19	8	0	0	0	0	0	0
	やや減少	8	3	2	12	1	12	0	0	0	0	0	0
	変化なし	0	0	0	1	0	0	16	15	14	11	17	12
	増加	0	0	0	0	0	0	4	5	6	9	3	8
皮膚弾性	上昇	13	17	19	9	20	10	0	0	0	0	0	0
	やや上昇	7	3	1	11	0	10	0	0	0	0	0	0
	変化なし	0	0	0	0	0	0	15	16	13	10	16	11
	低下	0	0	0	0	0	0	5	4	7	10	4	9

【0026】表2より、しわについては、本発明の実施例使用群において実施例4使用群で「変化なし」と評価されたパネラーが1例認められたのみで、他の実施例使用群ではいずれも減少傾向が見られた。特にチオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ水溶液の添加量の多い実施例2、実施例3及び実施例5使用群においては、しわの減少効果は顕著であった。また、チオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分を配合した化粧料である実施例4及び実施例6使用群においても、35%及び40%のパネラーにおいてしわの明確な減少を認めていた。

【0027】また、皮膚弾性については、実施例使用群では皮膚弾性の改善されなかったパネラーは認められなかった。特に実施例2使用群では85%、実施例3使用群では95%、実施例5使用群ではすべてのパネラーにおいて皮膚弾性の明らかな上昇が認められていた。

【0028】一方、比較例使用群ではしわ及び皮膚弾性について改善傾向の認められたパネラーは見られず、しわの増加、皮膚弾性の低下と、皮膚の老化症状が促進され、皮膚症状の悪化したパネラーも認められていた。

【0029】次に、本発明の各実施例と上記した比較例1～比較例6について、創傷治癒効果及び抗炎症作用について評価した。評価は、人工的に創傷又は炎症を生じさせたマウス各5匹を用い、実施例及び比較例の各試料を創傷部位又は炎症部位に0.5gずつ1日2回7日間塗布し、7日目に創傷又は炎症部位の状態を観察して行った。創傷の治癒については「完全治癒」、「ほぼ治癒」、「治癒が不完全」の3段階で、抗炎症作用については「有効」、「やや有効」、「無効」の3段階で評価した。ここで、創傷の治癒過程の70～80%程度まで

進行している場合に「ほぼ治癒」と評価し、炎症の改善が70～80%程度認められた場合に「やや有効」と評価した。結果は各評価を得たマウスの数にて表3に示した。

【表3】

項目	評価	実施例						比較例					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
創傷治癒状態	完全	2	3	3	1	4	1	0	0	0	0	0	0
	ほぼ治癒	3	2	2	4	1	4	0	0	0	0	1	0
抗炎症作用	不完全	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	0	5
	有効	3	4	4	2	6	2	0	0	0	0	0	0
用	やや有効	2	1	1	3	0	3	0	0	1	0	1	0
	無効	0	0	0	0	0	0	5	5	4	5	4	5

【0030】表3において、本発明の実施例塗布群では、創傷治癒が不完全であると認められたマウスは見られなかった。また、有効な抗炎症作用が見られなかったマウスも0であった。特に実施例5塗布群においては、5匹中4匹において完全に創傷の治癒が認められ、全マウスにおいて有効な抗炎症作用が認められた。牛胎盤抽出物のチオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分をそのまま配合した化粧料である実施例4及び実施例6塗布群においても、創傷の治癒傾向は全マウスで認められており、炎症の改善においてもかなり有効であった。

【0031】これに対し、比較例塗布群では、いずれにおいても完全治癒を認めたマウスは見られず、抗炎症作用についてもほとんど無効と評価された。

【0032】続いて、ヒトにおける皮膚の美白効果を使用試験により評価した。使用試験は、しみ、そばかす、日焼け等の色素沈着が顕著に認められる30才～50才代の女性パネラー20名ずつを1群とし、各群について実施例及び比較例の各試料をブラインドにて朝夕各1回、色素沈着の認められる部位に3カ月間継続して使用させて行った。美白効果は使用試験終了後の色素沈着部位のようすを観察して評価した。なお、実施例1～実施例3及び実施例5において、各0.5mg/mlのチオレドキシン・チオレドキシンリダクターゼ水溶液を1.0mg/mlのチオレドキシン水溶液に代替したものをそれぞれ比較例7～比較例9及び比較例11とし、実施例4及び実施例6において、チオレドキシンリダクターゼ画分を配合せずにチオレドキシン画分を倍量配合したものを比較例10及び比較例12とした。結果を表4に示す。

【表4】

試料		評価		
		消失	増化	変化なし
実施例	1	12	8	0
	2	15	5	0
	3	18	4	0
	4	6	13	1
	5	18	2	0
	6	7	13	0
比較例	7	3	13	4
	8	4	14	2
	9	4	13	3
	10	0	8	12
	11	5	14	1
	12	0	9	11

【0033】表4より明らかなように、本発明の実施例使用群においては、実施例4使用群で1例のみ変化を認めなかったのみで、その他は色素沈着症状の改善が認められた。特に実施例2、実施例3及び実施例5使用群では、75%～90%のパネラーにおいて色素沈着の消失が認められた。チオレドキシン及びチオレドキシンリダクターゼの絶対配合量が少ない化粧料である実施例4及び実施例6使用群でも、30%及び35%のパネラーにおいて色素沈着の完全な消失が認められた。

【0034】これに対し、比較例使用群では、若干の色素沈着の改善は認められるが、実施例使用群に比べて改善の度合いは低く、全く変化を認めないパネラーも全比較例使用群において認められ、特に比較例10使用群及び比較例12使用群では、半数以上のパネラーにおいて

色素沈着症状の改善が認められなかった。

【0035】なお、本発明の実施例については、上記使用試験の間に皮膚刺激性や感作性を認めたパネラーは全く見られなかった。

【0036】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明により、紫外線による皮膚の老化や炎症を防止し、良好な皮膚の賦活作用により優れた創傷治癒作用及び抗炎症作用を有し、さらに優れた美白作用を有する皮膚外用剤を得ることができた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 紫外線による細胞傷害防止作用を示す図である。

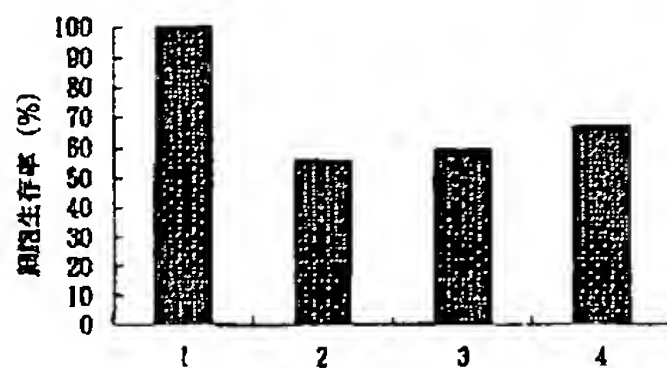
【図2】 線維芽細胞増殖促進作用を示す図である。

【図3】 チロシナーゼ生成阻害作用を示す図である。

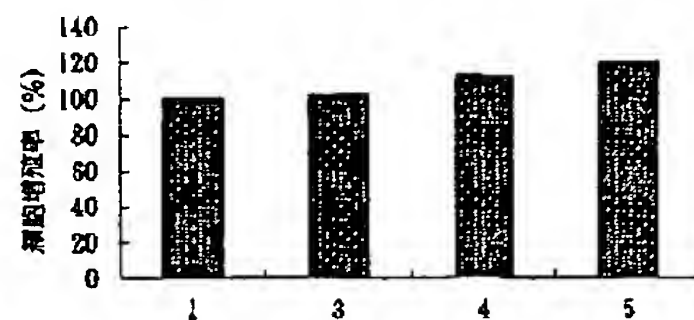
【符号の説明】

- 1 対照
- 2 Hank's緩衝液のみを添加した系
- 3 NADPHのみを添加した系
- 4 チオレドキシン画分及びチオレドキシンリダクターゼ画分を添加した系
- 5 チオレドキシン画分、チオレドキシンリダクターゼ画分及びNADPHを添加した系
- 6 乳酸ナトリウムを添加した系
- 7 チオレドキシン画分のみを添加した系

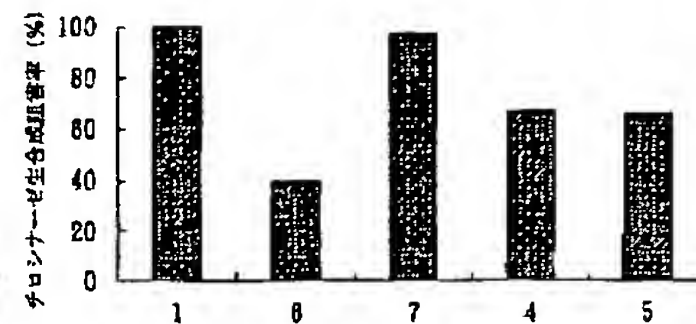
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成7年7月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正内容】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、紫外線等により生じた酸化ストレスから皮膚を保護し、さらに皮膚の線維芽細胞の増殖を促進して皮膚の老化を防止し、またチロシナ

ーゼ生成阻害作用により優れた美白効果を発揮し得る、非常に生理活性の高い皮膚外用剤に関する。さらに詳しくは、チオレドキシンとチオレドキシンリダクターゼの複合体、或いは前記複合体と還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）とを含有して成る皮膚外用剤に関する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明において、われわれは特にチオレドキシンを中心としたレドックス制御系に着目し、チオレドキシンとその還元酵素であるチオレドキシンリダクターゼの複合体を皮膚外用剤に配合することにより、酸化ストレスに対する抵抗性の向上、活性酸素種により生じる皮膚傷害の防止、改善作用の他に、優れた生理活性が得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。また、さらに水素供与体である還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）を加えることにより、前記の生理活性がさらに高められることを見出した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】 (3)チロシナーゼ生合成阻害効果

100 μg/mlのチオレドキシン画分及びチオレドキシン

リダクターゼ画分或いはさらに100 μg/mlのNADPHを、マウスB16メラノーマ細胞の懸濁液（細胞数50,000程度）に添加し、10重量%牛胎仔血清を添加したDMEM培地にて24時間培養を行った後、以下の方法により細胞中のチロシナーゼ活性を測定した。すなわち、1/15Mリン酸緩衝液（pH6.8）2mlに1.0重量%のドーパ水溶液0.5ml及び培養細胞液0.5mlを混合し、37℃にて1時間インキュベートした後、405nmにおける吸光度（As）を測定した。対照として、精製水を添加して同様に培養し、培養細胞液とドーパ水溶液とをインキュベートして吸光度（Ab）を測定し、式（1）によりチロシナーゼ生合成阻害率を求めた。なお、ポジティブコントロールとして乳酸ナトリウムを最終濃度が0.3mMとなるように添加した系（6）、及びチオレドキシン画分を単独で添加した系（7）についても、同様にチロシナーゼ生合成阻害率を測定した。結果は図3に示した。

【数1】

$$\text{チロシナーゼ生合成阻害率（％）} = \frac{A_s}{A_b} \times 100 \dots (1)$$

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶

A61K 38/44

識別記号

ADA

庁内整理番号

FI

A61K 37/50

技術表示箇所

ADA